

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Januar 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/00845 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/52,
9/78, 9/10, 9/88, 9/12, 1/21, C12P 17/18

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05864

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Juni 2000 (23.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
19929363.5 25. Juni 1999 (25.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF-LYNX BIOSCIENCE AG [DE/DE];
D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MACK, Matthias
[DE/DE]; Mönchhofstr. 3 C, D-69120 Heidelberg (DE).
HERBSTER, Karin [DE/DE]; Kolpingstr. 23a, D-76694
Forst (DE).

(74) Anwalt: GOLDSCHIED, Bettina; BASF Aktiengesellschaft,
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/00845 A1

(54) Title: GENES FROM *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* FOR THE BIOSYNTHESIS OF FOLIC ACID AND THEIR
USE FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF FOLIC ACID

(54) Bezeichnung: GENE AUS *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* FÜR DIE FOLSÄUREBIOSYNTHESE UND IHR EIN-
SATZ ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON FOLSÄURE

(57) Abstract: The invention relates to nucleotide sequences of four genes (*folE*, *folP*, *folB* and *folK*) from *Corynebacterium glu-*
tamicum for the biosynthesis of folic acid and their use for the microbial production of folic acid.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung besteht in Nucleotidsequenzen von vier Genen (*folE*, *folP*, *folB* und *folK*) aus
Corynebacterium glutamicum für die Folsäurebiosynthese und ihr Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure.

Gene aus *Corynebacterium glutamicum* für die Folsäurebiosynthese und ihr Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit dem Herstellungsverfahren für Folsäure durch Fermentation mit Hilfe eines gentechnisch veränderten Organismus. Diese Erfindung besteht aus den Nucleotidsequenzen von vier Genen (*folE*, *folP*, *folB* und *folK*) aus *Corynebacterium glutamicum* für die Folsäurebiosynthese und deren Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure. Diese vier Gene bilden ein Operon und werden in der folgenden Reihenfolge transkribiert: *folE*, *folP*, *folB*, *folK*.

15

Folsäure ist essentiell für tierische Organismen. Ihr Derivat Tetrahydrofolat ist in Zellen des tierischen Organismus ein sehr vielseitiger Carrier von aktivierten Einkohlenstoffeinheiten. Folsäure besteht aus drei Gruppen: einem substituierten Pteridinring, *p*-Aminobenzoat und Glutamat. Säuger können einen Pteridinring nicht synthetisieren. Sie nehmen Folsäure mit der Nahrung und von Mikroorganismen in ihrem Darmtrakt auf. Folsäuremangel führt hauptsächlich zu Läsionen in den Schleimhäuten.

25 Die kommerzielle Bedeutung der Folsäure liegt im Futtermittel- und Lebensmittelmarkt. Folsäure wird hauptsächlich als Nahrungsmittelzusatz eingesetzt.

Mikroorganismen können zur fermentativen Herstellung von Folsäure eingesetzt werden. Man kann sie durch gentechnische Veränderung des Biosynthesewegs der Folsäure in ihrer Folsäurebiosyntheseleistung optimieren. Gentechnische Veränderung bedeutet in diesem Zusammenhang, die Anzahl der Kopien und/oder die Transkriptionsgeschwindigkeit der Gene des Biosynthesewegs für die Folsäure zu erhöhen. Als Folge davon steigt der Anteil an Genprodukt und damit auch die intrazelluläre Enzymaktivität. Erhöhte Enzymaktivität führt zu einer vermehrten Umwandlungsgeschwindigkeit der Nahrung (z.B. Glucose) zu Folsäure und damit auch zu einer erhöhten Produktkonzentration. Zur gentechnischen Veränderung müssen die Nucleotidsequenzen der Gene des Folsäurebiosynthesewegs identifiziert werden. Diese Erfindung befaßt sich mit vier neuen Gensequenzen für die Folsäurebiosynthese aus *Corynebacterium glutamicum* und mit ihrem Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure.

45

- Ein Teil der Erfindung besteht im *folE*-Genprodukt. SEQ ID NR. 2 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folE*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 202 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22029 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 2 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 25% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 15% der Aminosäuren.
- 10 Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 2. Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem *folP*-Genprodukt. SEQ ID NR. 4 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folP*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 285 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 29520 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 4 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 40% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 25% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 4.
- 25

- Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem *folB*-Genprodukt. SEQ ID NR. 6 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folB*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 131 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 14020 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 6 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 30% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 20% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 6.
- 30

- 40 Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem *folK*-Genprodukt. SEQ ID NR. 8 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folK*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 160 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18043 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 8 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 30% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 20% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 8.
- 45

Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 40% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 30% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 8.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in den Polynucleotidsequenzen, die die oben beschriebenen Polypeptide kodieren. Die Polynucleotidsequenzen lassen sich ausgehend von Sequenzen, die man aus *Corynebacterium glutamicum* isoliert (d.h. SEQ ID NR. 1, 3, 5 und 7), erzeugen, in dem man diese Sequenzen durch ortsgerichtete Mutagenese modifiziert oder nach Rückübersetzung des entsprechenden Polypeptids mit dem genetischen Code eine chemische Total-synthese ausführt.

Diese Polynucleotidsequenzen lassen sich vorzugsweise einsetzen zur Transformation von Wirtsorganismen, und hierbei vorzugsweise von Mikroorganismen, und zwar in Form von Genkonstrukten, die zumindest eine Kopie eines dieser Polynucleotide zusammen mit mindestens einer regulatorischen Sequenz enthalten. Regulatorische Sequenzen beinhalten Promotoren, Terminatoren, Verstärker und ribosomale Bindungsstellen.

Bevorzugte Wirtsorganismen für die Transformation mit diesen Genkonstrukten sind *Corynebacterium*- und *Bacillus*-Arten. Auch jeden beliebigen eukaryontischen Mikroorganismus kann man einsetzen, vorzugsweise Hefestämme der Gattung *Ashbya*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* und *Hansenula*.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem Verfahren zur Herstellung von Folsäure durch Kultivierung eines Wirtsorganismus, der in der oben beschriebenen Art transformiert ist, und in der nachfolgenden Isolierung der Folsäure.

Die Verfahren und die Vorgehensweisen zur Kultivierung von Mikroorganismen und zur Isolierung von Folsäure aus einer mikrobiellen Produktion sind dem geschulten Personal geläufig.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung genauer beschrieben, ebenso ihre Anwendung zur gentechnischen Veränderung von Mikroorganismen zur Steigerung der Syntheseleistung von Folsäure.

Beispiel 1

Darstellung einer Genombibliothek aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

- 5 DNA aus dem Genom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 läßt sich nach Standardmethoden gewinnen, die bereits beschrieben sind, z. B. von J. Altenbuchner und J. Cullum (1984, Mol. Gen. Genet. 195:134-138). Die Genombibliothek läßt sich nach Standard-
- 10 vorschritten (z.B.: Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) mit jedem beliebigen Klonierungsvektor herstellen, z.B. pBluescript II KS- (Stratagene) oder ZAP Express™ (Stratagene). Dabei kann man jede beliebige Fragmentgröße benutzen, vorzugsweise Sau3AI-Frag-
- 15 mente mit einer Länge von 2-9 Kb, die sich in Klonierungsvektoren mit verdautem *Bam*HI einbinden lassen.

Beispiel 2

20 Analyse der Nucleinsäuresequenz der Genombibliothek

- Einzelne *E. coli*-Klone kann man aus der im Beispiel 1 dargestellten Genombibliothek auswählen. *E. coli*-Zellen werden nach Standardverfahren in geeigneten Medien kultiviert (z.B. LB ergänzt
- 25 mit 100 mg/l Ampicillin). Danach läßt sich die Plasmid-DNA isolieren. Klont man Genomfragmente aus der DNA von *Corynebacterium glutamicum* in pBluescript II KS- (siehe Beispiel 1), läßt sich die DNA mit Hilfe der Oligonucleotide 5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3' und 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' sequenzieren.

30

Beispiel 3

Computeranalyse der Sequenzen der isolierten Nukleinsäuren

- 35 Die Nucleotidsequenzen lassen sich z.B. mit Hilfe des BLASTX-Algorithmus (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410) aneinanderfügen. Auf diesem Weg kann man neuartige Sequenzen entdecken und die Funktion dieser neuartigen Gene aufklären.

40 Beispiel 4

- Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz des Gens für die GTP-Cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) enthält. Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 be-
- 45 schrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 1 beschrieben ist. Bei der Anwen-

5

dung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit GTP-Cyclohydrolasen I (FolE; EC 3.5.4.16) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der GTP-Cyclohydrolase-I (FolE) aus *Mycobacterium tuberculosis* (NRDB 5 006273; 72% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

Beispiel 5

Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz
10 des Gens für die Dihydropteroat-Synthase (EC 2.5.1.15) enthält

Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine
15 Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 3 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit Dihydropteroat-Synthasen (FolP; EC 2.5.1.15) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der Dihydropteroat-Synthase (FolP) aus *Mycobacterium tu-*
20 *berculosis* (NRDB 006274; 53% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

Beispiel 6

25 Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz des Gens für die Dihydroneopterin-Aldolase (EC 4.1.2.25) enthält

Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene
30 Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 5 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit Dihydroneopterin-Aldolasen (FolB; EC 4.1.2.25) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit
35 war mit der Dihydroneopterin-Aldolase (FolB) aus *Mycobacterium tuberculosis* (NRDB 006275; 61% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

Beispiel 7

40 Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz des Gens für die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropterin-din-pyrophosphokinase (EC 2.7.6.3) enthält

45 Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine

6

Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 7 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridin-pyrophosphokinase (FolK; EC 2.7.6.3) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridin-pyrophosphokinase (FolK) aus *Mycobacterium leprae* (EMBL AL023093; 43% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

10 Beispiel 8

Einsatz der Gene für die GTP-Cyclohydrolase I, für die Dihydropteroat-Synthase, für die Dihydroneopterin-Aldolase und für die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridin-pyrophosphokinase aus *Corynebacterium glutamicum* zur Herstellung von Folsäure

Die Gene für die GTP-Cyclohydrolase I, für die Dihydropteroat-Synthase, für die Dihydroneopterin-Aldolase und für die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridin-pyrophosphokinase aus *Corynebacterium glutamicum* lassen sich mit Hilfe geeigneter Klonierungs- und Expressionssysteme in *Corynebacterium glutamicum* oder in jeden beliebigen anderen Mikroorganismus einbringen. Man kann gentechnisch veränderte Mikroorganismen herstellen, die sich vom Wildtyp-Organismus hinsichtlich der Aktivität oder der Anzahl der Genkopien unterscheiden. Diese neuartigen, gentechnisch veränderten Stämme lassen sich zur Herstellung von Folsäure einsetzen.

Sequenzliste

30

(I) Allgemeine Angaben

(1) Anmelder:

35 (A) Name:	BASF-LYNX Bioscience AG
(B) Straße:	Im Neuenheimer Feld 515
(C) Stadt:	Heidelberg
(D) Land:	Deutschland
(E) Postleitzahl:	69120
40 (F) Telephone:	06221/4546
(G) Telefax:	06221/454770
(2) Titel:	Gene aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> für die Biosynthese der Folsäure und ihr Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure

(3) Anzahl der Sequenzen: 8

SEQ ID NR. 1: DNA (*foIE*)

5 ATGAAGGAGACAACCGTGGATAACACGCTGCAGTTCGCGAGTTCGATGAGGAGCGCGCAACAGC
TGCGATTTCGTGAGTTGCTCATCGCTGTGGGTGAGGATCCAGATCGCGAAGGCCTGTTGGAAGCCC
CAGCTCGAGTGGCTAGGGCGTACAAGGAACTTTCGCGGCTCTGCATGAGGATCCCACCACTGTG
CTGGAGAAGACGTTCTCTGAGGGCCATGAAGAGTTGGTTCTGGTTCTGTGAGATCCCGATTTACTC
CATGTGTGAGCACCACCTGGTGCCGTTCTTTGGCGTGCGGCACATTGGTTACATTCGCGGTAAGT
10 CCGGCAAGGTGACTGGCCTGTCCAAGCTGGCGCGTTTAGCGGATATGTTTGCTAAGCGACCTCAG
GTTCAAGAGCGCTTGACCTCCCAAATTGCGGATGCTCTCGTCGAAAAGCTTGATGCCAGGCCGT
GGCCGFGGTGATTGAAGCTGAGCACCTGTGCATGGCCATGCGCGGAATCCGTAAGCCTGGTGCTG
TGACCACGACGCTCGCGGTGCGCGCGGTTTAAAGAACACGCTGCCTCCCGCGCTGAGGTGTTT
TCCTTGATTGGGGGCACTAA

15

SEQ ID NR. 2: Aminosäure (*FoIE*)

MKETTVDNHAAVREFDEERATAAIRELLIAVGEDPDREGLLETPARVARAYKETFAGLHEDPTTV
LEKTFSEGHEELVLVREIPIYSMCEHHLVFFGVVAHIGYIPGKSGKVTLGSKLARLADMPAKRPQ
20 VQERLTSQIADALVEKLAQAVAVVIEAEHLCMAMRGIRKPGAVTTTSAVRGGFKNNAASRAEVF
SLIRGH

SEQ ID NR. 3: DNA (*foIP*)

25 ATGAACGTATCCTCTTTGACCATCCCGGACGCTGTTTGSTCATGGGAATTGTCAATGTCACTGA
GGATTCCTTTTCGGACGGTGCGCAAGTACATTGACGTTGATCAGGCGATCGCGCATGCCAAGGAAT
TGGTGGCTGCTGGCGCCGACATGATTGATGTCGGCGCGAGTCCACCCGGCTGGGGCAGTGCGC
GTCGACGCGTCCGTGGAACGGGACCGGGTTGTGCCGCTCATTAAGCGCTTCACGACGCCGCGCAT
CCACACTTCGCTAGACACCATGCGGGCTCCGTGGCGCAGGCTGCCCGGGCGCTGGCGTCTCCA
30 TGATCAACGACGCTCTCTGGCGGTTTGGCTGATCCTGAGATGTTTCTGTTCATGGCGGAAGCGCAA
ATTCCCGTGTGTTTGATGCACTGGCGCACCCCTCCAATTCGGTGATGCCGAGGTGAGGAGATCA
CGGTGGAGACGTTGTAGCCGATGTGCACGCAGTGCTTGATGATCTTGTGCCCGCGCCACCGCTG
CTGGTGTGGCCGAAAACCATGATCGTGCTTGATCCAGGTTTGGGTTTGTCCAAATCACGTGAAGAC
AACTGGCGTTTGTGCAAGCACTGCCCGAGTTTATTCTGGACCTTCCCCATCTGGTGGGAGC
35 ATCCCGGAAGCGATTCTTGCTGGCTGGCGTGGCAAAGACCGTGGCTTAGATGTACCCCCATTGATG
CCGACCCGACCAACCGCAGCGGTGACCGAGTGCTGCACATATGGGAGCATGGGGTGTGCGCGTG
CACGATGTCCAGTATCAAGGGACGCTGTTGATGTTGCCCATTTGTGGCGAAGTGAGGAACCTCA
CCATGGCTGA

40 SEQ ID NR. 4: Aminosäure (*FoIP*)

MNVSSLTIPGRCLVMGIVNVTEDSFSDDGGKYIDVDQAIHAHELVAAGADMIDVGGESTRPGAVR
VDASVERDRVVPVIXALHDAGIHTSVDIMRASVAQAAAGAGVSMINDVSGGLADPEMFVMAEAQ
IPVCLMHWRTLQFGDAAGQADHGGDVVADVHAVLDDLVARATAAGVAENQIVLDPGLGFAKSRED
45 NWRLQLALPEFISGPPFILVGASRKRFLAGVRKDRGLDVTPIADAPATAAVTAVSAHMGAWGVVR
HDVPVSRDAVDVAALWRSGGTHHG

SEQ ID NR. 5: DNA (*folB*)

ATGGCTGATCGTATTGAACTTAAAGGCCTTGAATGCTTCGGACACCACGGTGTGTTGCACTTTGA
AAAAGAGCAAGGCCAGCCCTTCATTGTGGATGTACCTGCTGGATGGATTTTCGATGCCGCAGGTG
5 CCAGCGATGACCTTTCCGACACCGTAGATTACGGCGCGTTGGCATTGTTGGTTGCTGAAATCGTG
GAAGGCCCATCCAGGGATTGATCGAGACGGTGGCCACGGAATCTGCGGATGCTGTGATGGCTAA
ATTTGATCGCGCTTCATGCGGTGGAAGTAACCATCCATAAGCCCAAAGCACCGATCCCACGTACTT
TTGCTGACGTCGCGGTGGTTGCCCGACGTTCCAGGAAATCCATGCGCTGCTGGAAGGAGCAACGCC
TAA

10

SEQ ID NR. 6: Aminosäure (*FolB*)

MADRIELKQLECFHHGVDFEKEQGQFFIVDVTWMDFDAAGASDDLSDTVDYGALALLVAEIV
EGPSRDLIETVATESADAVMAKFDALHAVEVTIHKPKAPIPRTFADVAVVARRSRKSMAGRSNA

15

SEQ ID NR. 7: DNA (*folK*)

ATGCATGCAGTTTTTGTCCATCGGTTCCAACATGGATGATCGCTACGCGCTGCTCAACACAGTGAT
CGAGGAATTCAAAGATGAGATCGTGGCGCAGTCTGCGATCTACTCAACCCCAACCGTGGGGCATTG
20 AGGATCAGGATGAATTCCCTCAACGCAGTGCTCGTTGTTGAGGTTGAAGAAAACCCCATCGAGTTG
CTGCGCCGTGGCCAAAACTCGAAGAAGCCGCCGAGCGGGTCCGCGTCCGCAAAATGGGGGCCACG
CACCTCGATGTGGATATCGTGCAGATCATTAAAGATGGGGAAGAGATCCTTTCTGAGGATCCCG
AACTGACCTTGCCACACCCTTGGGCTTGGCAGCGTGCC TTCGTCTTGATCCCTTGGTTGGAAGCA
GAACCTGATGCCGTCCGTGCACGGCACGACCATTCAGAAACATGTGGATAATCTTGATCCACAGA
25 CATTGAAGTGTCACCAAGATTTAA

SEQ ID NR. 8: Aminosäure (*FolK*)

MHAVLSIGSNMDDRYALLNTVIEEFKDEIVAQSAIYSTPPWGIEDQDEFLNAVLVVEVEETPIEL
30 LRRGQKLEEAERVRVRKWGPRTLVDIVQIIKDGEEILSEDPELTLPHPWAWQRAFLIPWLEA
EPDAVLHGTTIAEHVDNLDPDIEGVTKI

35

40

45

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid mit GTP-Cyclohydrolase-I-Aktivität, das aus
5 folgender Gruppe ausgewählt ist:
 - (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der
SEQ ID NR. 2 beschrieben ist
 - 10 (b) ein Polypeptid das im Vergleich zu dem in (a) durch Dele-
tion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer
Aminosäuren verändert ist.
2. Ein Polypeptid mit Dihydropteroat-Synthaseaktivität, das aus
15 folgender Gruppe ausgewählt ist:
 - (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der
SEQ ID NR. 4 beschrieben ist;
 - 20 (b) ein Polypeptid das im Vergleich zu dem in (a) durch Dele-
tion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer
Aminosäuren verändert ist.
3. Ein Polypeptid mit Dihydroneopterin-Aldolaseaktivität, das
25 aus folgender Gruppe ausgewählt ist:
 - (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der
SEQ ID NR. 6 beschrieben ist
 - 30 (b) ein Polypeptid, das im Vergleich zu dem in (a) durch
Deletion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer
Aminosäuren verändert ist.
4. Ein Polypeptid mit 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydrop-
35 teridin-pyrophosphokinaseaktivität, das aus der folgenden
Gruppe ausgewählt ist:
 - (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der
SEQ ID NR. 8 beschrieben ist
 - 40 (b) ein Polypeptid, das im Vergleich zu (a) durch Deletion,
Insertion oder Substitution einer oder mehrerer Amino-
säuren verändert ist.

45

10

5. Ein Polynucleotid, das ein dem Anspruch 1, 2, 3 oder 4 entsprechendes Polypeptid kodiert.
6. Ein Genkonstrukt mit mindestens einer Kopie eines dem Anspruch 5 entsprechenden Polynucleotids zusammen mit mindestens einer regulatorischen Sequenz.
7. Ein Wirtsorganismus, der mit einem dem Anspruch 6 entsprechenden Genkonstrukt transformiert ist.
8. Verfahren zur Herstellung von Folsäure durch Kultivieren eines dem Anspruch 7 entsprechenden Wirtsorganismus mit nachfolgender Isolierung der Folsäure.

15

20

25

30

35

40

45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: Final Application No
PCT/EP 00/05864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N9/78 C12N9/10 C12N9/88 C12N9/12
C12N1/21 C12P17/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Z95557 AL123456, 20 May 1997 (1997-05-20) COLE S T ET AL: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 153/162" XP002153566 cited in the application the whole document	1-3,5
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession U72662; U60993, 19 November 1996 (1996-11-19) CHISTOSERDOVA L ET AL: "Methylobacterium extorquens methylotrophy region containing ... XP002153567 the whole document	4,5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

22 November 2000

04/12/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/05864

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 761 818 A (TORAY INDUSTRIES) 12 March 1997 (1997-03-12) the whole document	
A	IWAI K ET AL: "OCCURRENCE OF CRITHIDIA FACTORS AND FOLIC-ACID IN VARIOUS BACTERIA" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 104, no. 1, 1970, pages 197-201, XP000960985 ISSN: 0021-9193 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05864

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0761818 A	12-03-1997	CN 1149626 A	14-05-1997
		JP 9121881 A	13-05-1997
		US 5968788 A	19-10-1999
		JP 9121882 A	13-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Anlageskizzen
PCT/EP 00/05864

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12N15/52 C12N1/21	C12N9/78 C12P17/18
C12N9/10	C12N9/88	C12N9/12
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 C12N C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Z95557 AL123456, 20. Mai 1997 (1997-05-20) COLE S T ET AL: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 153/162" XP002153566 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-3,5
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession U72662; U60993, 19. November 1996 (1996-11-19) CHISTOSERDOVA L ET AL: "Methylobacterium extorquens methylotrophy region containing ... XP002153567 das ganze Dokument	4,5
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
22. November 2000	04/12/2000	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Beauftragter	
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Lejeune, R	

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05864

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 761 818 A (TORAY INDUSTRIES) 12. März 1997 (1997-03-12) das ganze Dokument	
A	IWAI K ET AL: "OCCURRENCE OF CRITHIDIA FACTORS AND FOLIC-ACID IN VARIOUS BACTERIA" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 104, Nr. 1, 1970, Seiten 197-201, XP000960985 ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05864

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0761818 A	12-03-1997	CN 1149626 A	14-05-1997
		JP 9121881 A	13-05-1997
		US 5968788 A	19-10-1999
		JP 9121882 A	13-05-1997